

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02564

研究課題名(和文) 分泌細胞における新しいカルシウムストアとCa²⁺放出の誘導機構研究課題名(英文) A novel calcium store and Ca²⁺ release in secretory cells

研究代表者

平嶋 尚英 (Hirashima, Naohide)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：10192296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、アレルギー疾患の原因となるマスト細胞からのアレルギー誘発物質の分泌に必須であるカルシウムチャネルOraiのうち、サブタイプの一つのOrai2がアレルギー誘発物質を貯蔵・分泌する分泌顆粒に発現することを見出した。そこで我々は分泌顆粒が細胞内Ca²⁺ストアとして働き、マスト細胞の刺激によって細胞内Ca²⁺濃度上昇に寄与する可能性を検証した。そのために、分泌顆粒内のCa²⁺濃度を測定する蛍光タンパク質をベースとしたプローブの開発に成功した。しかしながら、マスト細胞の刺激に伴う細胞内Ca²⁺濃度上昇とともに起こると期待された分泌顆粒内のCa²⁺濃度の減少は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国民の半数が何らかのアレルギー疾患を有するといわれており、その原因となるマスト細胞からのアレルギー誘発物質の分泌機構を明らかにすることは重要である。我々はこの分泌に必須である細胞内Ca²⁺濃度上昇を担うCa²⁺チャネルOraiの一つであるOrai2がアレルギー誘発物質を貯蔵・分泌する分泌顆粒膜に発現することを見出した。そこで、分泌顆粒が細胞内Ca²⁺ストアとして働き、分泌を増強する可能性を検証した。マスト細胞の刺激に伴う分泌顆粒内のCa²⁺濃度の減少は観察されなかったが、そのために開発した分泌顆粒内Ca²⁺濃度を測定するプローブは他の分泌細胞にも適用でき、分泌機構解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that one of the subtypes of the calcium channel Orai, which is essential for the secretion of inflammatory mediators from mast cells, is expressed on secretory granules that store and secrete mediators. We examined the possibility that secretory granules work as an intracellular Ca²⁺ store and contribute to the increase in intracellular Ca²⁺ concentration by stimulating mast cells. We have succeeded in developing a fluorescent protein-based probe that monitors Ca²⁺ concentration in secretory granules. However, no decrease in intracellular Ca²⁺ concentration, which was expected to occur with an increase in intracellular Ca²⁺ concentration associated with mast cell stimulation, was observed.

研究分野：生物物理学

キーワード：カルシウムストア 分泌細胞 Orai マスト細胞 エクソサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

我々はアレルギー疾患の原因となるマスト細胞からの炎症性メディエーターのエクソサイトーシスによる分泌機構について研究を行ってきた。マスト細胞には、ヒスタミン等の炎症性メディエーターを含む分泌顆粒があり、細胞が活性化されるとその分泌顆粒が細胞膜と融合し、メディエーターが細胞外に分泌され、アレルギー反応が惹起される。この分泌は受容体刺激に続いておこる細胞内のCa²⁺濃度の上昇によってトリガーされる。このCa²⁺濃度上昇は、Caストア（小胞体；ER）からのCa²⁺の放出と、Caストアの枯渇により活性化される細胞膜のCaチャンネルOraiを介した細胞外からのCa²⁺の流入によるものである。そして、このOraiの活性化は、Caストア（ER）内のCa²⁺センサー蛋白質であるSTIMによって誘導される。OraiにはOrai-1、-2、-3の3つのサブタイプがあるが、マスト細胞には3つすべてが発現している。我々は近年、マスト細胞ではOrai-2が分泌顆粒膜に局在していることを見出し（図1）、エクソサイトーシスによる分泌を正に制御していることを明らかにした。さらに興味深いことに、Orai-2をノックダウンすると細胞内CaストアからのCa²⁺放出（細胞外Ca²⁺濃度がゼロの条件での細胞内Ca²⁺濃度上昇）が低下することを見出した（Ikeya M., et al., (2014) 文献）。

分泌顆粒内にはmMオーダーの高濃度のCa²⁺が存在すること、また、予備的な研究では、刺激に伴い分泌顆粒内のCa²⁺濃度が低下することを見出していることから、ERだけでなく分泌顆粒がCaストアとして働き、分泌顆粒からのCa²⁺放出が、分泌顆粒のOrai-2とCaストア（ER）のSTIM

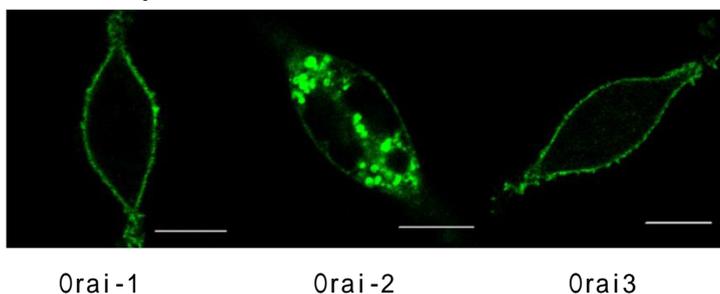


図1 マスト細胞におけるOraiのサブタイプごとの分布

との相互作用によって誘導されることが強く示唆する。

本研究によって、分泌顆粒がCaストアとして働き、分泌顆粒からのCa²⁺放出が、分泌顆粒のOrai-2とCaストア（ER）のSTIMとの相互作用によって誘導されるという仮説を検証する。

2. 研究の目的

アレルギー疾患の原因となる分泌細胞であるマスト細胞からのエクソサイトーシスによる分泌は、受容体刺激後の細胞内のCa²⁺濃度の上昇によってトリガーされる。このCa²⁺濃度上昇は、Caストア（小胞体；ER）からのCa²⁺の放出と、Caストアの枯渇により活性化される細胞膜のCaチャンネルOraiを介した細胞外からのCa²⁺の流入によるものである。OraiにはOrai-1、-2、-3の3つのサブタイプがあるが、我々は、マスト細胞ではOrai-2が分泌顆粒膜に局在していることを見出した。

本研究では、分泌顆粒がCaストアとして働き、分泌顆粒からのCa²⁺放出が、分泌顆粒のOrai-2とCaストア（ER）のSTIMとの相互作用によって誘導されるという、新しいCaストアからのCa²⁺放出機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マスト細胞のモデル細胞として、ラット好塩基球白血病細胞株であるRBL-2H3細胞を使用した。この細胞を、イーグルMEM培地（ニッスイ）に0.29 mg/mL L-glutamine（Wako）と2 mg/mL NaHCO₃、10% FBS（Sigma-Aldrich）を添加した培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件下で培養した。

(2) hGHss-D1

分泌顆粒内のCa²⁺濃度を測定するために、FRETをベースとしたCa²⁺センサーであるCFP-D1-Citrineに分泌顆粒局在化シグナル配列であるヒト成長ホルモン（human Growth Hormone; hGH）を付加したキメラタンパク質のDNAを構築した。

(3) 細胞への遺伝子導入

RBL-2H3 細胞を Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit R を用いて、Amaxa Nucleofector (Lonza, Free Program: T-020) を用いたエレクトロポレーションにより遺伝子導入を行った。エレクトロポレーション後の細胞を滅菌済の ZOG-3 ガラス OG チャンバー (Elekon Science) に播種し、24 ~ 48 時間後に共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-800, Carl Zeiss) で観察した。

(4) 画像解析による細胞質及び細胞内オルガネラの Ca²⁺濃度動態の測定

小胞体内の Ca²⁺濃度は、FRET をベースとした Ca²⁺センサーである D1-ER のプラスミド DNA を細胞内に導入することにより測定した。

分泌顆粒内の Ca²⁺濃度は、FRET をベースとした Ca²⁺センサーを分泌顆粒に局在化させるために human Growth Hormone のシグナル配列 (hGHss) を付加したキメラタンパク質である hGHss-D1 のプラスミド DNA (図2) を細胞内に導入することにより測定した。

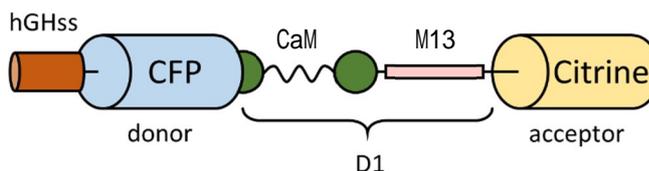


図2 分泌顆粒内の Ca²⁺濃度センサー

4. 研究成果

(1) 分泌顆粒に局在化させるために human Growth Hormone のシグナル配列 (hGHss) を付加した FRET ベースの Ca²⁺センサータンパク質である hGHss-D1 を RBL-2H3 細胞に発現させたところ、期待したように、分泌顆粒内に局在することが明らかとなった (図3)。

(2) ジニトロフェニル基に対する IgE で感作した RBL-2H3 細胞を DNP-HSA で抗原刺激したところ、細胞質の Ca²⁺濃度の上昇と ER 内の Ca²⁺濃度の減少は確認できたが、分泌顆粒内の Ca²⁺濃度変化を CFP と Citrine の間の FRET 効率

$$\text{FRET 効率} = \frac{F(\text{Citrine})}{F(\text{CFP})}$$

によって評価したところ、変化は認められなかった (図4)。

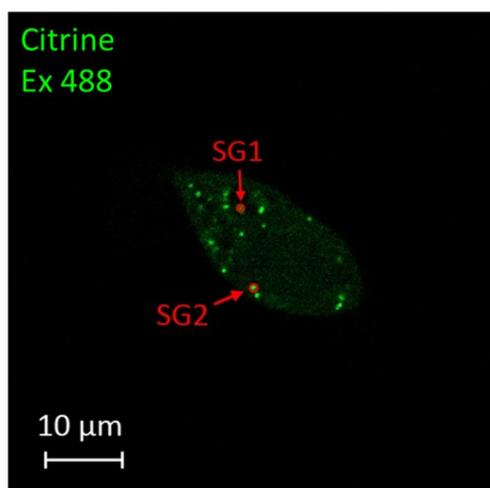


図3 分泌顆粒内 Ca²⁺濃度センサーの細胞内分布
hGHss-D1 の蛍光が分泌顆粒に局在して、ドット上に蛍光を発するのが観察された。

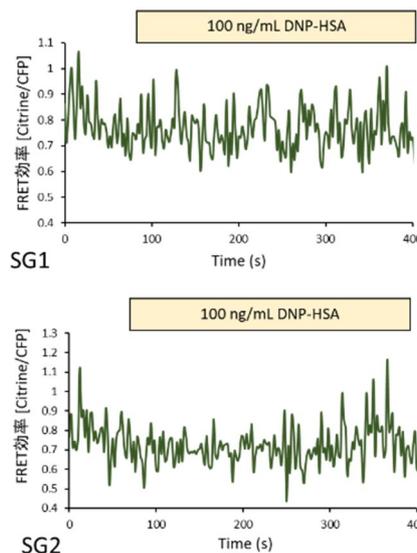


図4 分泌顆粒内 Ca²⁺濃度変化
図3の分泌顆粒(SG1とSG2)の顆粒内 Ca センサーの FRET 効率をプロットした。

< 引用文献 >

Miho Ikeya, Kiyoshi Yamanoue, Yuji Mochizuki, Hirofumi Konishi, Satoshi Tadokoro, Masahiko Tanaka, Ryo Suzuki and Naohide Hirashima
Orai-2 is localized on secretory granules and regulates antigen-evoked Ca²⁺ mobilization and exocytosis in mast cells
Biochem. Biophys. Res. Commun 451 62-67 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ruriko Suzuki, Yoshikazu Inoh, Yokawa, Ryo. Suzuki, Tadahide Furuno, Naohide Hirashima	4. 巻 49
2. 論文標題 Monomer Hapten and Hapten-Specific IgG Inhibit Mast Cell Activation Evoked by Multivalent Hapten With Different Mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2172-2183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/eji.201847973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ruriko Suzuki, Yoshikazu Inoh, Satoru Yokawa, Tadahide Furuno, Naohide Hirashima	4. 巻 534
2. 論文標題 Receptor dynamics regulates actin polymerization state through phosphorylation of cofilin in mast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 714-719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二宮 里帆、服部 幸希、鈴木 瑠理子、田中 正彦、平嶋 尚英
2. 発表標題 マスト細胞の活性化における分泌顆粒膜タンパク質Orai-2の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>
名古屋市立大学大学院薬学研究科 研究室教員一覧
<https://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/seimei/chobunshi.html>
名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------